

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-43284

(43) 公開日 平成7年(1995)2月14日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 5/02	A	6928-2 J		
C 1 2 Q 1/00	Z	6807-4 B		
1/58		6807-4 B		
G 0 1 N 33/62	A	7055-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平5-190584

(22) 出願日 平成5年(1993)7月30日

(71) 出願人 000000295

沖電気工業株式会社

東京都港区虎ノ門1丁目7番12号

(72) 発明者 斎藤 稔

東京都港区虎ノ門1丁目7番12号 沖電気工業株式会社内

(72) 発明者 海部 勝晶

東京都港区虎ノ門1丁目7番12号 沖電気工業株式会社内

(72) 発明者 加藤 雅一

東京都港区虎ノ門1丁目7番12号 沖電気工業株式会社内

(74) 代理人 弁理士 大垣 孝

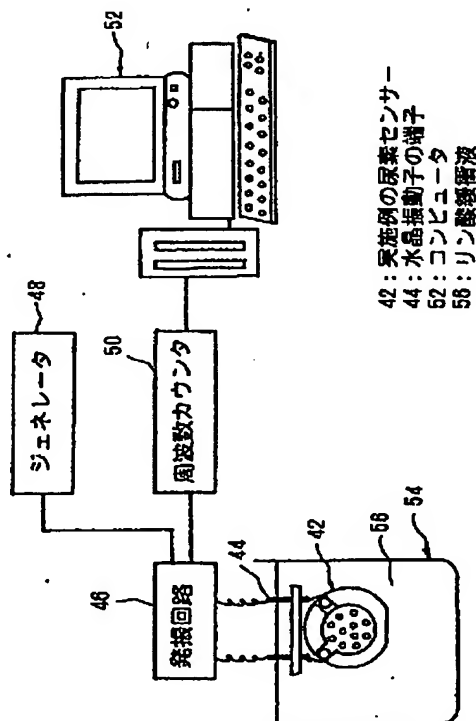
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学物質量の定量方法、これに用いる酵素センサーおよびその製造方法

(57) 【要約】

【目的】 化学物質量の量を短時間に定量することができる化学物質量の定量方法これに用いる酵素センサーおよびその製造方法の提供。

【構成】 尿素センサー42のウレアーゼを固定した水晶振動子30の端子44は、発振回路46と接続している。発振回路46は、ジェネレータ(電源)48と接続してある。また、発振回路の46の出力端は周波数カウンタ50とも接続してあり、この周波数カウンタ50はコンピュータ52と接続してある。尿素センサー42は、ピーカ54中のpH7.2のリン酸緩衝液56に浸漬してある。



第1実施例の尿素センサーの応答特性の測定系

(2)

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 水晶振動子に酵素を固定し、該酵素が特定の化学物質を分解する酵素反応により該化学物質を前記水晶振動子の表面に付着させた場合の発振周波数と、該化学物質が付着していない場合の前記水晶振動子の発振周波数とをそれぞれ比較することにより、化学物質を定量することを特徴とする化学物質の定量方法。

【請求項2】 表面弾性波素子に酵素を固定し、該酵素が特定の化学物質を分解する酵素反応により該化学物質を前記表面弾性波素子の表面に付着させた場合の発振周波数と、該化学物質が付着していない場合の前記表面弾性波素子の発振周波数とを比較するか、または、該化学物質が前記表面弾性波素子の表面に付着させた場合の共振周波数と、該化学物質が付着していない場合の前記表面弾性波素子の共振周波数とを比較することにより、化学物質を定量することを特徴とする化学物質の定量方法。

【請求項3】 請求項1または2に記載の化学物質の定量方法において、前記酵素を前記水晶振動子または前記表面弾性波素子に固定するにあたり、前記酵素とグルタルアルデヒドとの共有結合を利用することを特徴とする化学物質の定量方法。

【請求項4】 請求項1または2に記載の化学物質の定量方法において、前記酵素を前記水晶振動子または前記表面弾性波素子に固定するにあたり、アビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用することを特徴とする化学物質の定量方法。

【請求項5】 請求項1または2に記載の化学物質の定量方法において、前記酵素を前記水晶振動子または前記表面弾性波素子に固定するにあたり、ストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用することを特徴とする化学物質の定量方法。

【請求項6】 請求項1または2に記載の化学物質の定量方法において、前記酵素をウレアーゼとし、尿素量を定量することを特徴とする化学物質の定量方法。

【請求項7】 水晶振動子に酵素を固定してなることを特徴とする酵素センサー。

【請求項8】 表面弾性波素子に酵素を固定してなることを特徴とする酵素センサー。

【請求項9】 請求項7または8に記載の酵素センサーにおいて、前記酵素と前記水晶振動子または前記表面弾性波素子との固定を、前記酵素とグルタルアルデヒドとの共有結合を利用して行うことを特徴とする酵素センサー。

【請求項10】 請求項7または8に記載の酵素センサ

2

ーにおいて、

前記酵素と前記水晶振動子または前記表面弾性波素子との固定を、アビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用して行うことを特徴とする酵素センサー。

【請求項11】 請求項7または8に記載の酵素センサーにおいて、

前記酵素と前記水晶振動子または前記表面弾性波素子との固定を、ストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用することを特徴とする酵素センサー。

10 【請求項12】 請求項7または8に記載の酵素センサーにおいて、

前記酵素をウレアーゼとすることを特徴とする酵素センサー。

【請求項13】 請求項7または8に記載の酵素センサーを製造するにあたり、

前記酵素と前記水晶振動子または前記表面弾性波素子との固定を、前記酵素とグルタルアルデヒドとの共有結合を利用して行うことを特徴とする酵素センサーの製造方法。

20 【請求項14】 請求項7または8に記載の酵素センサーを製造するにあたり、

前記酵素と前記水晶振動子または前記表面弾性波素子との固定を、アビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用して行うことを特徴とする酵素センサーの製造方法。

【請求項15】 請求項7または8に記載の酵素センサーを製造するにあたり、

30 前記酵素と前記水晶振動子または前記表面弾性波素子との固定を、ストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用して行うことを特徴とする酵素センサーの製造方法。

【請求項16】 請求項13、14または15に記載の酵素センサーの製造方法において、

前記酵素をウレアーゼとすることを特徴とする酵素センサーの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、化学物質の定量方法、これを用いる酵素センサーおよびその製造方法に関する。

40 【0002】

【従来の技術】 近年、医療分野において、有機物質を選択的に定量する化学センサーが要望されている。例えば、臨床検査において、患者の血精および体液中の尿素の定量分析は腎機能を診断する上で重要である。また、慢性腎不全の患者に人工透析を行う際に、人工透析の回数および透析時間の目安を与え、計画的な人工透析を行う上でも尿素の定量分析は不可欠である。

【0003】 これまで、例えば、文献1：「バイオセンサー、鈴木周一編、講談社サイエンティフィック刊（1984年）」によれば、化学センサーの認識機能部に酵

50

(3)

3

素の優れた分子認識機能を利用する試みがなされている。酵素が特定の化学物質（以下、基質とも称する）を認識しその化学物質に特異的な反応を触媒することによって増減する物質を酸素電極、過酸化水素電極、水素電極、アンモニア電極、二酸化炭素電極、イオン選択性FET電極等で電気信号に変換して定量する酵素センサーが提案されている。

【0004】従来の酵素センサーの一例として、図面を参照して、尿素センサーについて簡単に説明する。図9は、従来の尿素センサーの説明に供する断面図である。この尿素センサーは、多孔質ガラス膜12に固定されたウレアーゼ28によって尿素から分解生成した NH_4^+ を、アンモニア選択透過膜26を介して銀-塩化銀電極24で電気信号に変換して定量している。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、例えば、上述した尿素センサーでは、先ず、基質（この場合は尿素）が酵素固定化膜内に拡散し、そこでの酵素反応による生成物（ NH_4^+ ）がさらに、その生成物を選択的に透過する膜（アンモニア選択透過膜）を拡散した後に電極（銀-塩化銀電極）に到達する構造であった。このため、測定を開始してから尿素センサーから出力される電気信号が一定値になるまで時間を要するという欠点があった。

【0006】このため、この出願に係る発明者は種々の検討を重ねた結果、水晶振動子の発振周波数、または、表面弾性波素子の発振周波数若しくは共振周波数が、これら水晶振動子または表面弾性波素子に付着する物質の質量に比例して減少することに着目した。（以下、水晶振動子および表面弾性波素子を併せて振動子と称する。また、発振周波数および共振周波数を併せて振動数と称する。）このような現象は、例えば、文献I：「生物物理、vol. 28, No. 6（1988）」に記載されている。文献Iによれば、二分子膜被覆水晶振動子を用いることにより、匂い物質および苦み物質のセンシングが可能なが示されている。

【0007】そこで、この発明者は、種々の実験および検討をさらに重ねた結果、振動子に酵素を固定し、この振動子の振動数の変化を検出することにより、拡散過程を経ずに基質の量を定量する方法を見出した。

【0008】この発明は、このような点に鑑みてなされたものであり、従って、この出願に係る第1の目的は、化学物質の量を短時間に定量することができる化学物質の定量方法を提供することにある。また、この出願に係る第2の目的は、第1の目的の化学物質の定量方法に用いる酵素センサーを提供することにある。また、この発明の第3の目的は、第2の目的の酵素センサーの製造方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】この目的の達成を図るた

4

め、この発明の化学物質の定量方法によれば、水晶振動子に酵素を固定し、この酵素が特定の化学物質を分解する酵素反応により化学物質を水晶振動子の表面に付着させた場合の発振周波数と、化学物質が付着していない場合の水晶振動子の発振周波数とをそれぞれ比較することにより、化学物質を定量することを特徴とする。

【0010】また、この発明の化学物質の定量方法によれば、表面弾性波素子に酵素を固定し、この酵素が特定の化学物質を分解する酵素反応により化学物質を表面弾性波素子の表面に付着させた場合の発振周波数と、化学物質が付着していない場合の表面弾性波素子の発振周波数とを比較するか、または、化学物質が前記表面弾性波素子の表面に付着させた場合の共振周波数と、化学物質が付着していない場合の表面弾性波素子の共振周波数とを比較することにより、化学物質を定量することを特徴とする。

【0011】また、この発明の化学物質の定量方法を実施するにあたり、酵素を水晶振動子または表面弾性波素子に固定するにあたり、酵素とグルタルアルデヒドとの共有結合を利用することが望ましい。

【0012】また、この発明の化学物質の定量方法を実施するにあたり、酵素を水晶振動子または表面弾性波素子に固定するにあたり、アビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用することが望ましい。

【0013】また、この発明の化学物質の定量方法を実施するにあたり、酵素を水晶振動子または表面弾性波素子に固定するにあたり、ストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用することが望ましい。

【0014】また、この発明の化学物質の定量方法は、酵素をウレアーゼとし、尿素量を定量するのに用いて好適である。

【0015】また、この発明の酵素センサーによれば、水晶振動子に酵素を固定してなることを特徴とする。

【0016】また、この発明の酵素センサーによれば、表面弾性波素子に酵素を固定してなることを特徴とする。

【0017】また、この発明の酵素センサーの実施にあたり、酵素と水晶振動子または表面弾性波素子との固定を、酵素とグルタルアルデヒドとの共有結合を利用して行うことが望ましい。

【0018】また、この発明の酵素センサーの実施にあたり、酵素と水晶振動子または表面弾性波素子との固定を、アビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用することが望ましい。

【0019】また、この発明の酵素センサーの実施にあたり、酵素と水晶振動子または表面弾性波素子との固定を、ストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用することが望ましい。

【0020】また、この発明の酵素センサーの実施にあ

(4)

5

たり、酵素をウレアーゼとすると良い。

【0021】また、この発明の酵素センサーを製造するにあたり、酵素と水晶振動子または表面弾性波素子との固定を、酵素とグルタルアルデヒドとの共有結合を利用して行うことが望ましい。

【0022】また、この発明の酵素センサーを製造するにあたり、酵素と水晶振動子または表面弾性波素子との固定を、アビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用して行うことが望ましい。

【0023】また、この発明の酵素センサーを製造するにあたり、酵素と水晶振動子または表面弾性波素子との固定を、ストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用して行うことが望ましい。

【0024】また、この発明の酵素センサーを製造方法を実施するにあたり、酵素をウレアーゼとすると良い。

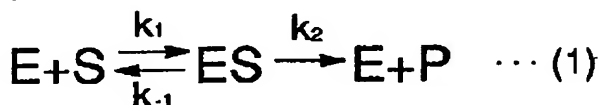
【0025】

【作用】この発明によれば、振動子に酵素を固定化し、この振動子の振動数の変化を検出することにより、拡散過程を経ずに化学物質（基質）の量を定量することができる。

【0026】振動子に酵素を固定化し、下記の式（1）に示す、この酵素が特定の化学物質（基質）を分解する酵素反応

【0027】

【化1】



【0028】（但し、E、S、ESおよびPは、それぞれ遊離の酵素、化学物質（基質）、酵素－基質複合体および生成物である。また、 k_1 、 k_{-1} および k_2 は、それぞれES複合体の生成反応と解離反応およびESから生成物の速度定数である。）により、酵素－基質複合体を生成させてこの化学物質を振動子に付着させ、この化学物質の付着による振動子の振動数の変化から化学物質を定量することを特徴とする。この方法によれば、定量する化学物質や酵素反応による生成物が拡散する固定を経ずに、上記式（1）に示す酵素反応が定常状態になることにより、振動子への化学物質の付着量が一定値になれば、その時点での振動子の振動数変化から化学物質量を定量することができる。

【0029】また、この発明の酵素センサーの製造方法によれば、水晶振動子へ酵素を固定するにあたり、酵素とグルタルアルデヒドとの共有結合、アビジンとビオチンとの特異的結合反応またはストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合反応を用いるので、酵素を水晶振動子へ強固に結合することができる。

【0030】

【実施例】以下、図面を参照して、この発明の化学物質

6

量の定量方法並びにそれに用いる酵素センサーおよびその製造方法の実施例について併せて説明する。尚、以下の実施例で用いる使用材料およびその量、処理時間、処理温度等の数値的条件は好適例にすぎず、従って、この発明は、これら条件に限定されるものでないことは明らかである。

【0031】第1実施例

第1実施例では、この発明の化学物質量の定量方法、これを用いる酵素センサーおよびその製造方法の一例として、水晶振動子に酵素としてウレアーゼを固定してなる、尿素量の定量方法、これを用いる尿素センサーおよびその製造方法について説明する。

【0032】第1実施例で用いる水晶振動子は、いわゆるATカット水晶振動子が好適である。ATカット水晶振動子を用いることによって、

1. 温度変化に対する周波数変動が小さいため、化学物質量の定量時の温度の違いによる測定誤差が生じにくいこと、
2. 厚み滑り振動をするため、化学物質量付着量に対する周波数変動が顕著であること、といった利点が得られるからである。

【0033】尿素FETセンサの製造（その1）

図1の（A）～（C）は、第1実施例の尿素センサーおよびその製造方法の説明に供する工程図である。各図では、模式的に1つの酵素について図示している。

【0034】先ず、水晶振動子30の表面にグラタールアルデヒドを介して酵素としてウレアーゼ40を固定する方法について述べる。

【0035】先ず、水晶振動子をシランカップリング剤で処理して表面にアミノ基を形成する。この実施例では、シランカップリング剤としてアミノプロピルトリエトキシシラン（チッソ社製）を用い、この1体積%水溶液に室温で1時間浸漬する。その後、水晶振動子を、純水中で20kHzの超音波を30分間照射することによって洗浄し、余分なアミノプロピルトリエトキシシランを除去する。次に、水晶振動子を110℃の温度下で20分間加熱処理することによってアミノプロピルトリエトキシシランと水晶振動子30の表面との間に共有結合を形成する（図1の（A））。

【0036】次に、この水晶振動子を1体積%のグルタールアルデヒド水溶液に1時間浸漬することにより、グルタールアルデヒドとアミノプロピルトリエトキシシランとの間に共有結合を形成する。その後、水晶振動子30を純水中で20kHzの超音波を30分間照射することによって洗浄し、余分なグルタールアルデヒドを除去する（図1の（B））。

【0037】次に、この水晶振動子30をウレアーゼ（フナコシ製薬製）40を1mg含む100mlのpH7.2のリン酸緩衝液中に水晶振動子を2時間浸漬する。この間にウレアーゼ40がグルタールアルデヒドを

(5)

7

介して水晶振動子30に固定される。未反応のウレアーゼは、pH7.2のリン酸緩衝液で洗浄することにより除去する(図1の(C))。

【0038】尿素センサーの製造(その2)

図2の(A)～(C)は、第1実施例の尿素センサーおよびその製造方法の説明に供する工程図である。各図では、模式的に1つの酵素について図示している。

【0039】次に、水晶振動子30の表面にアビジンおよびビオチンを介して酵素としてウレアーゼ40を固定する方法について述べる。

【0040】まず、水晶振動子30をシランカップリング剤で処理して表面にアミノ基を形成する。この実施例では、シランカップリング剤としてアミノプロピルトリエトキシシラン(チッソ社製)を用い、この1体積%水溶液に室温で1時間浸漬する。その後、水晶振動子30を、純水中で20kHzの超音波を30分間照射することによって洗浄し、余分なアミノプロピルトリエトキシシランを除去する。次に、水晶振動子30を110℃の温度下で20分間加熱処理することによってアミノプロピルトリエトキシシランと水晶振動子30の表面との間に共有結合を形成する(図1の(A))。

【0041】次に、この水晶振動子30にビオチン34を結合させるために、この水晶振動子を0.1mg/mlの濃度のNHS-LC-ビオチン(商品名)フナコシ製薬製、以下、ビオチンロングアームとも称する)36を含むpH8.0の重炭酸緩衝液に浸漬することにより、ビオチンロングアーム36とアミノプロピルトリエトキシシランとの間に共有結合を形成する。その後、水晶振動子10を純水中で20kHzの超音波を30分間照射することによって洗浄し、余分なビオチンロングアームを除去する(図1の(B))。

【0042】次に、文献III:「ザ・ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー(The Journal of Cell Biology) Vol. 93, pp. 981-986 (1982)」に記載されているヴァーノン(Vernon)の方法を用いて、アビジン38としてアビジンD(商品名)フナコシ製薬製)38を結合させたウレアーゼ40を1mg含む100mlのpH7.2のリン酸緩衝液中に水晶振動子30を2時間浸漬する。この間にビオチン34とアビジン38とが特異的結合反応をする。未反応のウレアーゼは、pH7.2のリン酸緩衝液で洗浄することにより除去する(図1の(C))。

【0043】以上の工程を経て、水晶振動子30の表面にウレアーゼ40を固定して、尿素センサーを製造した。尚、ウレアーゼ40の固定化の方法は、これらに限られるものではなく、ストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合を用いても、同様な効果が得られる。

【0044】尿素センサーの特性

次に、グルタルアルデヒドを介して水晶振動子30に

8

酵素としてウレアーゼ40を固定してなる尿素センサーの応答特性について以下のように測定した。

【0045】図3は、第1実施例の尿素センサーの応答特性の測定に用いた系を示したブロック図である。尿素センサー42のウレアーゼを固定した水晶振動子30の端子44は、発振回路46と接続している。発振回路46は、ジェネレータ(電源)48と接続してある。また、発振回路の46の出力端は周波数カウンタ50とも接続しており、この周波数カウンタ50はコンピュータ52と接続してある。尿素センサー42は、ピーカ54中の蒸留水56に浸漬してある。

【0046】この尿素センサー42をpH7.2のリン酸緩衝液56に浸漬した状態で、このリン酸緩衝液に尿素を所定量加える。そして、リン酸緩衝液中に尿素を加えた後5分経過後の水晶振動子の発振周波数(振動数)を測定する。そして、この振動数から尿素を加える前の振動数を減ずることによる振動数変化を求めた。リン酸緩衝液中に尿素を加えた5分経過後に振動数を測定したのは、後述するように、このような経過時間であると振動数が十分に安定したからである。

【0047】図4は、上述した測定系で測定した、尿素センサーの特性図である。図4のグラフの横軸は、リン酸緩衝液に加える尿素量(g/ml)を示し、縦軸は、尿素センサーの振動子の振動数変化(Hz)を示している。グラフ中の直線Iは、両者をプロットしたものを結んだものである。図4のグラフから明らかなように、尿素量の増加に伴い、振動子の振動数がほぼ一定の割合で減少していくことがわかる。また、このような振動数の変化は、グルコース等の他の化学物質質量に対しては全く見られなかった。従って、この実施例の尿素センサーは、尿素センサーとして十分な特性が得られていることがわかった。

【0048】次に、図5に第1実施例の尿素センサーおよび比較例の尿素センサーを 10^{-3} g/mlの尿素量を含むリン酸緩衝液にそれぞれ浸漬した場合の出力信号の経時変化の測定結果のグラフを示す。グラフの横軸は、測定開始からの経過時間(分)を示し、縦軸は、出力信号として発振周波数および出力電位の変化量を、それぞれの飽和状態での変化量を100として相対値で示している。グラフ中の曲線IIは、第1実施例の尿素センサーの発振周波数の経時変化を示しており、グラフ中の曲線IIIは、比較例として、従来例で説明した尿素センサーの出力電圧の経時変化を示している。図5のグラフから明らかなように、比較例の尿素センサーでは、出力電圧の変化量が飽和値に達するのに約20分要したのに対し、第1実施例の尿素センサーでは、1分以内に周波数の変化量がほぼ飽和値に達した。このように、この発明の化学物質質量の定量方法およびそれを用いた酵素センサーの一例である尿素センサーによって、化学物質質量の量を短時間に定量することができることがわかった。

(6)

9

【0049】また、ストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合を利用してウレアーゼを固定して製造した尿素センサーの場合も、グルタルアルデヒドを用いた場合と同様に1分以内に周波数の変化量がほぼ飽和値に達した。

【0050】第2実施例

第2実施例では、この発明の化学物質量の定量方法、これを用いる酵素センサーおよびその製造方法の一例として、表面弾性波素子に酵素としてウレアーゼを固定してなる、尿素量の定量方法、これを用いる尿素センサーおよびその製造方法について説明する。

【0051】尿素センサーの製造

第2実施例においては、第1実施例と同一の方法を用いて、水晶振動子の代わりに表面弾性波素子にウレアーゼを結合させる。

【0052】尿素センサーの応答特性

次に、グルタルアルデヒドを介して表面弾性波素子70にウレアーゼ40を結合した尿素センサー60の応答特性について以下のように測定した。

【0053】図6は、第2実施例の尿素センサーの応答特性の測定に用いた系を示したブロック図である。この尿素センサー60は、増幅器62および64と接続してある。増幅器62および64間に周波数カウンタ（図示せず）を接続して発振周波数を測定する。尿素センサー60は水槽66中のpH7.2のリン酸緩衝液68中に浸漬してある。第2実施例では、表面弾性波素子70としてSTカット水晶板72上に第1および第2のトランデューサ74および76を設けたものを用い、これらトランデューサ74および76間の水晶板72上にウレアーゼ40を結合させている。

【0054】この実施例では、尿素センサー60をリン酸緩衝液68に浸漬した状態で、このリン酸緩衝液68中に尿素を所定量加える。そして、リン酸緩衝液中に尿素を加えた後5分経過後の尿素センサーの発振周波数を測定する。溶液中に尿素を加えた後5分経過後に発振周波数を測定したのは、このような経過時間であると表面弾性波素子の発振周波数が十分に安定したからである。

【0055】次に、図7に尿素センサーの応答特性の測定結果を示す。図7のグラフの横軸は溶液中の尿素濃度（g/ml）を示し、縦軸は尿素センサーの発振周波数（以下、振動数とも称する）変化（kHz）を示している。グラフ中の直線IVは、上述した方法で製造したこの実施例の尿素センサーの各測定尿素濃度における振動数変化のプロットを結んだものである。図7のグラフから明らかなように、尿素量の増加にともない、振動数が一定の割合で減少していくことがわかる。また、この尿素センサーは、グルコース等の尿素以外の化学物質量に対しては発振周波数に応答がなかった。従って、本実施例では尿素センサーとして十分な特性が得られたことが確認できた。

10

【0056】次に、図8に第2実施例の尿素センサーおよび比較例の尿素センサーを 10^{-3} g/mlの尿素量を含むリン酸緩衝液にそれぞれ浸漬した場合の出力信号の経時変化の測定結果を示す。グラフの横軸は、測定開始からの経過時間（分）を示し、縦軸は、発振周波数および出力電位の変化量を、それぞれの飽和状態での変化量を100として相対値で示している。グラフ中の曲線Vは、第2実施例の尿素センサーの発振周波数の経時変化を示しており、グラフ中の曲線IIIは、比較例として、従来例で説明した尿素センサーの出力電圧の経時変化を示している。図5のグラフから明らかなように、比較例の尿素センサーでは、出力電圧の変化量が飽和値に達するのに約20分要したのに対し、第2実施例の尿素センサーでは、1分以内に発振周波数の変化量がほぼ飽和値に達した。このように、この発明の化学物質量の定量方法およびこれを用いた酵素センサーの一例である尿素センサーによって、化学物質量の量を短時間に定量することができることが確認できた。

【0057】また、ストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合を利用してウレアーゼを固定して製造した尿素センサーの場合も、グルタルアルデヒドを用いた場合と同様に1分以内に発振周波数の変化量がほぼ飽和値に達した。

【0058】また、上述した第2実施例では、尿素センサーの出力信号として、表面弾性波素子の発振周波数を測定したが、この発明では表面弾性波素子の共振周波数を測定しても良い。

【0059】

【発明の効果】この発明によれば、振動子に酵素を固定し、酵素反応により酵素-基質複合体を振動子に付着させ、この付着量に応じたこの振動子の振動数の変化を検出する。このため、定量する化学物質量や酵素反応による生成物が拡散する過程を経ずに酵素反応が定常状態になることにより、振動子への化学物質量の付着量が一定値になれば、その時点での振動子の振動数変化から化学物質量を定量することができる。その結果、従来の化学物質量の定量方法と比較して短い時間で定量することができる。

【0060】また、この発明の酵素センサーの製造方法によれば、水晶振動子へ酵素を固定するにあたり、酵素とグルタルアルデヒドとの共有結合、アビジンとビオチンとの特異的結合反応またはストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合反応を用いるので、酵素を水晶振動子へ強固に結合することができる。

【0061】また、この発明は、例えば尿素量の定量に用いて好適である。

【図面の簡単な説明】

【図1】（A）～（C）は、第1実施例の尿素センサーおよびその製造方法の説明に供する工程図である。

【図2】（A）～（C）は、第2実施例の尿素センサー

BEST AVAILABLE COPY

(7)

11

およびその製造方法の説明に供する工程図である。

【図3】第1実施例の尿素センサーの応答特性の測定に用いた系を示したブロック図である。

【図4】第1実施例の尿素センサーの応答特性の測定結果を示すグラフである。

【図5】第1実施例の尿素センサーおよび比較例の尿素センサーの出力信号の経時変化の測定結果を示すグラフである。

【図6】第2実施例の尿素センサーの応答特性の測定に用いた系を示したブロック図である。

【図7】第2実施例の尿素センサーの応答特性の測定結果を示すグラフである。

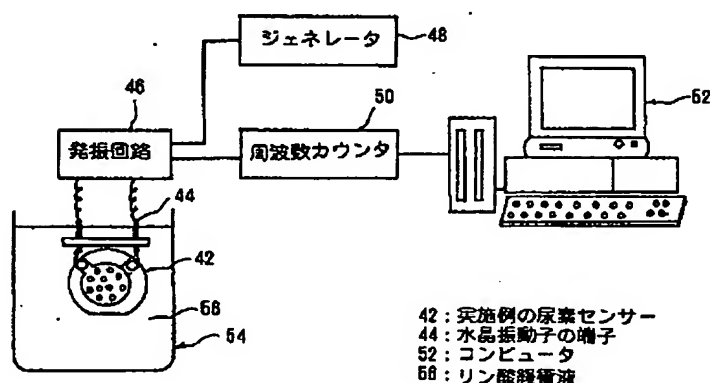
【図8】第2実施例の尿素センサーおよび比較例の尿素センサーの出力信号の経時変化の測定結果を示すグラフである。

【図9】従来の尿素センサーの説明に供する断面図である。

【符号の説明】

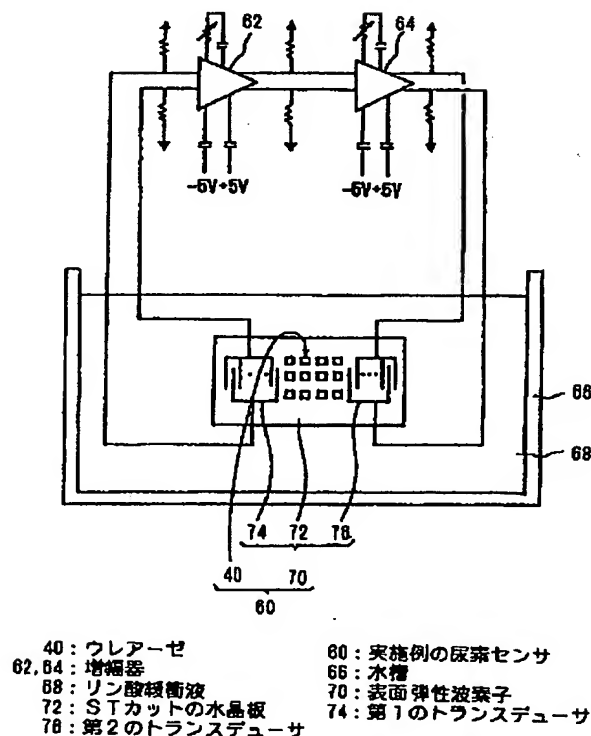
- | | |
|----------------|------------|
| 12: 多孔質ガラス膜 | 14: ウレアーゼ |
| 24: 銀-塩化銀電極 | |
| 26: アンモニア選択透過膜 | |
| 28: 尿素 | 30: 水晶振動子 |
| 34: ビオチン | |
| 36: ビオチンロングアーム | 38: アビジン |
| 40: ウレアーゼ | |
| 42: 尿素FETセンサー | 44: 端子 |
| 46: 発振回路 | 48: ジェネレータ |
| 50: 周波数カウンタ | 52: コンピュータ |
| 54: ビーカ | 56: リン酸緩衝液 |
| 60: 尿素センサー | 62: 増幅器 |
| 64: 増幅器 | 66: 水槽 |
| 68: リン酸緩衝液 | |
| 70: 表面弾性波素子 | 72: 水晶板 |
| 74: トランスデューサ | |
| 76: トランスデューサ | |

【図3】



第1実施例の尿素センサーの応答特性の測定系

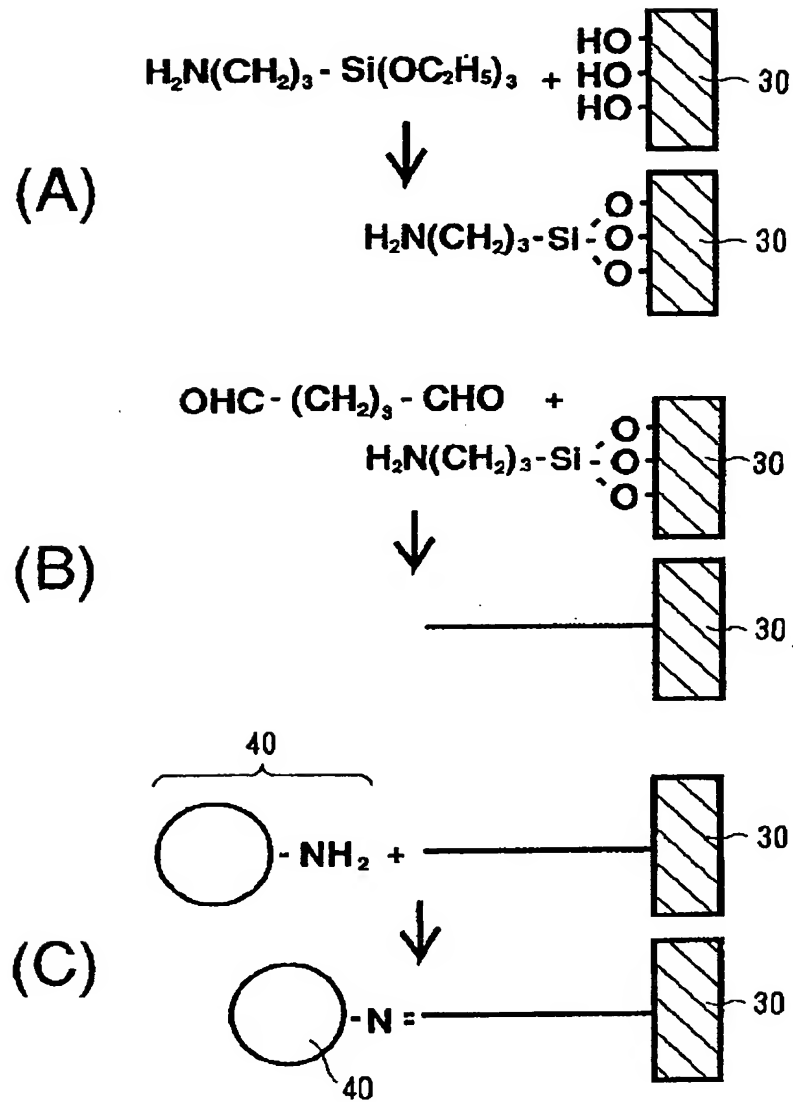
【図6】



第2実施例の尿素センサーの応答特性の測定系

(8)

【図1】



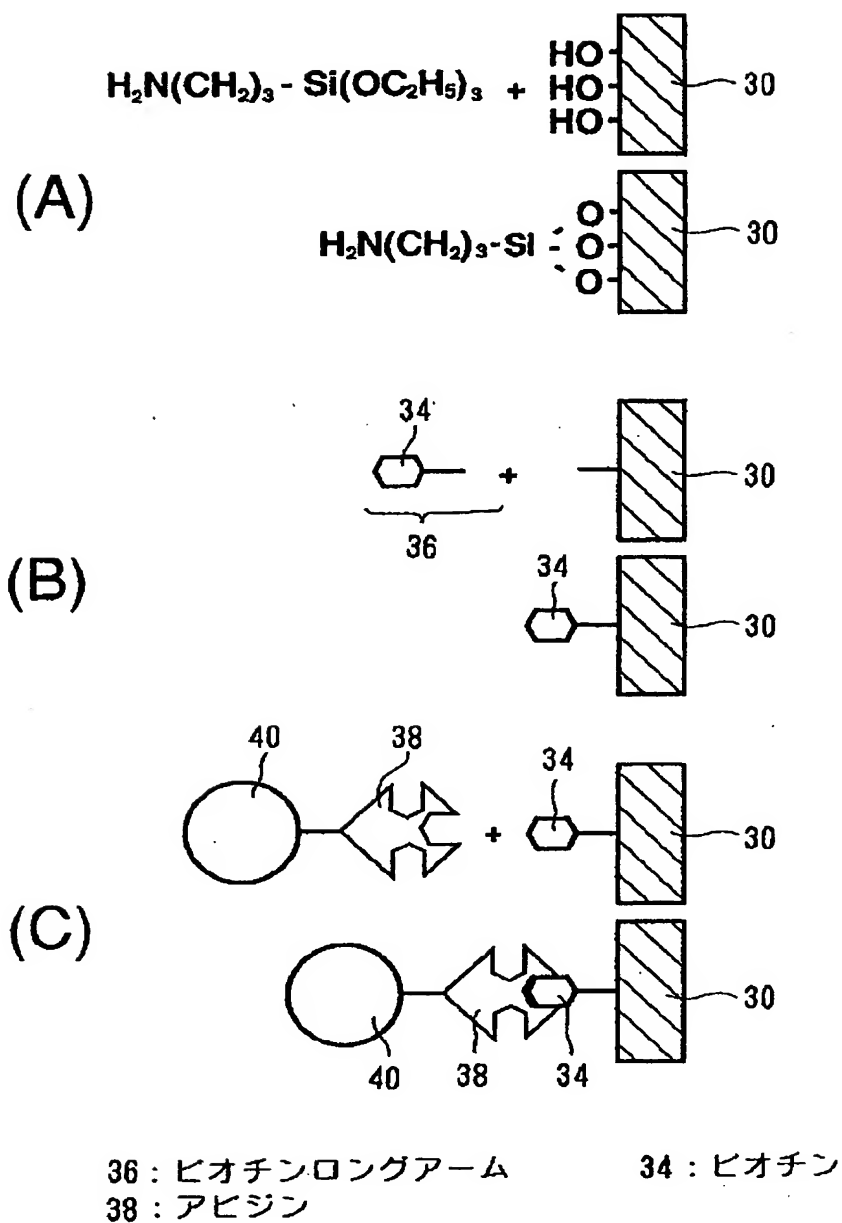
30 : 水晶振動子 40 : ウレアーゼ

第1実施例の尿素センサーの製造工程図

BEST AVAILABLE COPY

(9)

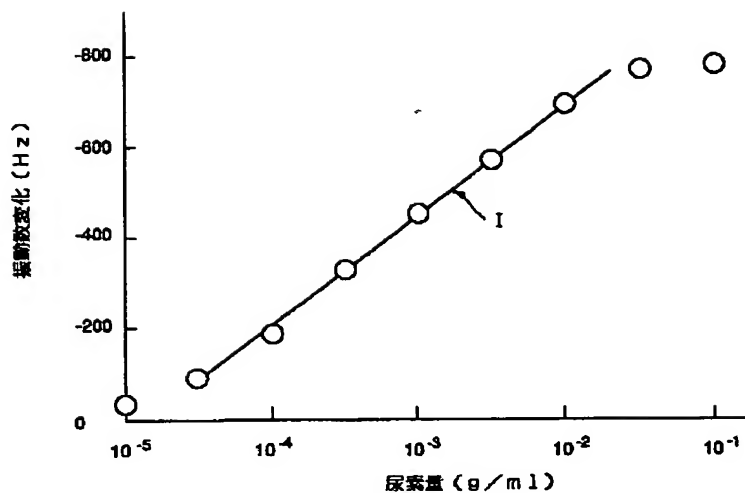
【図2】



第2実施例の尿素センサーの製造工程図

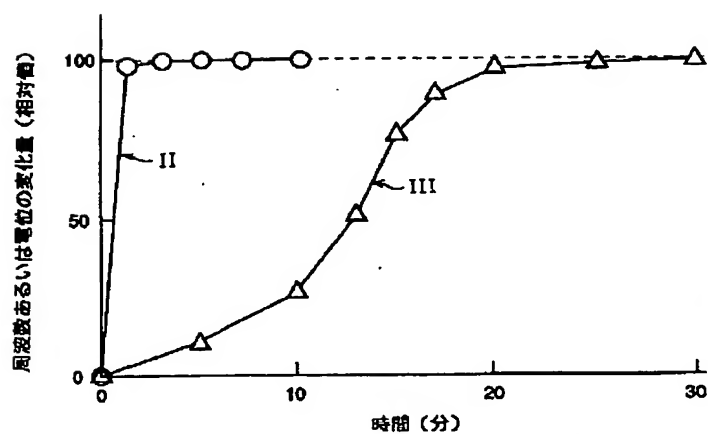
(10)

【図4】



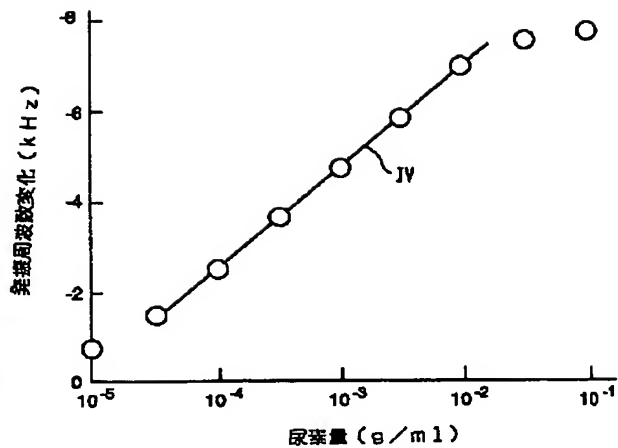
第1実施例の尿素センサーの応答特性図

【図5】



第1実施例の尿素センサーの出力信号の経時変化

【図7】

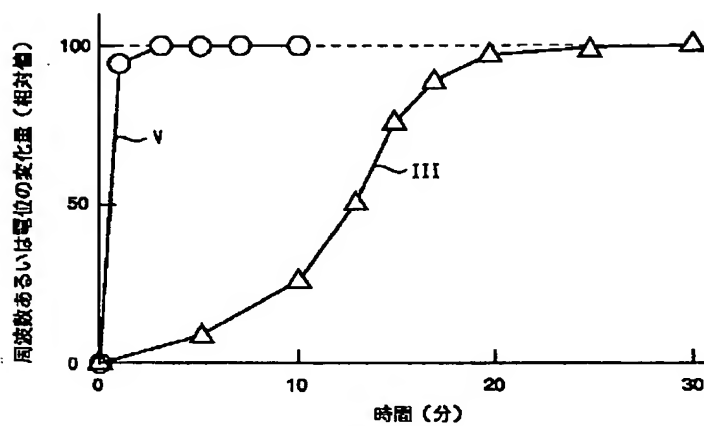


第2実施例の尿素センサーの応答特性図

BEST AVAILABLE COPY

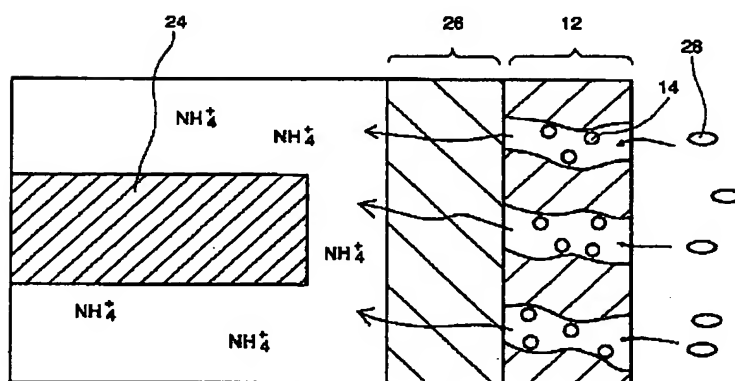
(11)

【図8】



第1実施例の尿素センサーの出力信号の経時変化

【図9】



12 : 多孔質ガラス膜 24 : 銀-塩化銀電極
 26 : アンモニア選択透過膜 28 : 尿素

従来の尿素センサーの構造

フロントページの続き

(72)発明者 宮本 裕生
 東京都港区虎ノ門1丁目7番12号 沖電気
 工業株式会社内